

BEEINFLUSSUNG
DER CHROMOSOMENSCHÄDIGENDEN
AKTIVITÄT VON TRENIMON AN MENSCHLICHEN
LYMPHOZYTEN IN VITRO DURCH VITAMIN C

von
Klaus Grziwok
aus
Regensburg

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. R. A. Pfeiffer

BEEINFLUSSUNG DER CHROMOSOMENSCHÄDIGENDEN AKTIVITÄT VON TRENIMON AN MENSCHLICHEN LYMPHOZYTEN IN VITRO DURCH VITAMIN C

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Klaus Grziwok

aus

Regensburg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. E. Gebhart

Korreferent: Prof. Dr. R.A. Pfeiffer

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.1980

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methodik	2
2.1. Kulturansatz und Chromosomenpräparation	2
2.2. Testsubstanzen und Applikation	3
2.3. Zytogenetische Auswertung	4
3. Ergebnisse	6
3.1. Zytogenetische Aktivität von Trenimon und Vitamin C	6
3.2. Dosisabhängigkeit des Effektes von Vita- min C bei gleichzeitiger Einwirkung von Trenimon	6
3.3. Effekt bei verlängerter Einwirkung von Vitamin C	8
3.4. Verteilungsmuster von Metaphasen mit einer bestimmten Anzahl von Gaps, Brü- chen oder Aberrationen	9
3.5. Beeinflussung des Mitoseindex	10
3.6. 5-Bromdesoxyuridin (BrDU)-Versuche	10
4. Diskussion	12
4.1. Wertung der Befunde	12
4.2. Biochemische Aktivität der Testsubstan- zen und Wirkungsmechanismen	15
4.3. Schlußfolgerungen	17
5. Zusammenfassung	19
6. Tabellen und Abbildung	20
7. Literatur	31



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. Einleitung

Bereits seit längerer Zeit sind Schutzstoffe gegen die mutagene bzw. chromosomenschädigende Wirkung energiereicher Strahlen bekannt (BACQ 1965; RIEGER und MICHAELIS 1967). Hingegen ist eine Beeinflussung der chemischen Mutations- und Aberrationsauslösung mit Hilfe von Protektoren bisher nur in geringem Umfang versucht worden (AVANZI 1957, 1961; BONATI, SAVINO 1965; RIEGER und MICHAELIS 1967; GEBHART 1968, 1972, 1973; RÖHRBORN 1968; KAUL 1969), dabei konnte festgestellt werden, daß bekannte Radioprotektoren auch eine Schutzwirkung gegenüber einigen Clastogenen entfalten (GEBHART 1972; STOSIEK und GEBHART 1974; GEBHART und BECHER 1976). Hinweise aus der Literatur, wonach Vitamin C sowohl die durch energiereiche Strahlen (BARTHELMESS et al. 1965, 1968) als auch die durch chemische Mutagene (SHAMBERGER et al. 1973) hervorgerufene chromosomale Aberrationsauslösung beeinflußt, sowie die Vorstellung, möglichst einen natürlichen und gut verträglichen Bestandteil pflanzlicher oder tierischer Zellen als Schutzsubstanz zu verwenden, führten zu der vorliegenden Studie.

Als Testsystem wurden menschliche Lymphozytenkulturen verwendet, da sie für Untersuchungen von chromosomalen Strukturdefekten ein anerkanntes sensibles Standard-Testsystem darstellen. Das trifunktionelle Äthyleniminderivat Trenimon wurde als Modell-Aberrationsinduktor (Clastogen) verwendet, da dieses Zytostatikum bezüglich seiner stark chromosomenschädigenden Aktivität und der Breite des induzierten Aberrationsspektrums schon gut untersucht ist (HAMPEL 1968; GEBHART 1970, 1971; BECHER und GEBHART 1973) und ein Schutz gegen die erbgutschädigende Nebenwirkung von Alkylantien in Zukunft therapeutisch an Bedeutung gewinnen dürfte.

Wichtigstes Ziel dieser Untersuchung ist es, eine Antwort auf die Frage zu erhalten, ob Vitamin C in menschlichen Lymphozytenkulturen eine Wirkung auf die clastogene Akti-

vität von Trenimon ausübt. Ferner soll untersucht werden, ob hierbei die Konzentration und die Einwirkungsdauer der Ascorbinsäure einen modifizierenden Einfluß auf die Aberationsauslösung ausüben. Eine Vortäuschung von Effekten durch Beschleunigung oder Verzögerung des Zellzyklus infolge selektiver Mechanismen soll durch Versuche mit BrDU-Markierung der DNS ausgeschlossen werden.

2. Material und Methodik

2.1. Kulturansatz und Chromosomenpräparation

Aus heparinisiertem (100 IE Heparin/ml) Armvenenblut von gesunden Probanden wurden Lymphozytenkulturen nach der leicht abgewandelten Methode von MOORHEAD et al. (1960) angesetzt. Jede Kultur enthielt 15 Tropfen Vollblut, 0,5 ml fetales Kälberserum (Ass. Biomedic. System INC) und 4,5 ml penicillinhaltiges (600 IE/ml) Medium Ham's F 10 (Seromed). Zur Stimulierung der Zellteilung wurden jeder Kultur 2 Tropfen gereinigtes Phytohämagglutinin (Wellcome) beigefügt. Die zur Analyse der Chromosomen- und der Kerndifferenzierung bestimmten Versuchsansätze wurden mit 5-Bromdesoxyuridin (BrDU) versetzt, das unter Lichtschutz in Aqua bidest gelöst wurde. Um die Teilung der in Metaphase befindlichen Zellen zu blockieren, erhielt jede Kultur 2 Stunden vor Aufbereitung 0,2 ml Colcemid (8×10^{-7} g/ml Endkonzentration). Die Kulturdauer betrug insgesamt 72 Stunden bei 37° C.

Die abzentrifugierten Zellen wurden 3 Minuten mit einer hypotonen Lösung (KCl 0,7 %, 37° C) behandelt, erneut abzentrifugiert und in einem Gemisch aus Methanol/Eisessig (3:1) etwa 30 Minuten lang fixiert. Nach mehrmaligem Auswaschen der Zellen wurden diese auf gekühlte Objektträger aufgebracht und luftgetrocknet. Die Präparate wurden 2 Stunden mit Aceto-Orcein gefärbt und anschließend mit Eukitt eingedeckt.

Bei den mit BrDU behandelten Kulturen wurden die beschichteten Objektträger jedoch mindestens 9 Tage unter Ausschluß von Licht gelagert und anschließend nach der Methode von KORENBERG und FREEDLENDER (1974) gefärbt. Die Präparate wurden hierbei bei $88-90^{\circ}\text{C}$ in einem Pufferbad ($1\text{ M NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8,00) 20 Minuten lang inkubiert, ca. 30 Sekunden in Aqua dest. abgekühlt, 12 Minuten in Giemsa-Lösung gefärbt (2 % Giemsa-Lösung in $2,5 \times 10^{-3}\text{ M}$ Phosphatpuffer pH 6,88) und ca. 4 Sekunden in Aqua dest. differenziert. Nach erneutem Lufttrocknen wurden Dauerpräparate hergestellt.

2.2. Testsubstanzen und Applikation

Die chemischen Strukturformeln der Testsubstanzen zeigt Abb. 1. Als Clastogen wurde Trenimon (2, 3, 5-Tris-äthyleniminobenzochinon (1,4)), als potentielltes Anticlastogen Vitamin C (L (+) Ascorbinsäure) verwendet. Die Herstellung der Lösungen erfolgte bei Trenimon mit isotoner Kochsalzlösung und Aqua bidest. unmittelbar vor der Zugabe, bei Vitamin C nur mit Aqua bidest. unter gleichzeitigem Schutz vor Lichteinwirkung. Dabei betrug die Endkonzentration von Trenimon in den Versuchen 10^{-7} Mol/l ; die Vitamin C Endkonzentrationen betrugen zwischen $5 \times 10^{-5}\text{ Mol/l}$ und 10^{-3} Mol/l ; sie sind bei den Versuchen nochmals angegeben. Die Ausgangslösungen waren in ihrer Konzentration jeweils so bemessen, daß nur geringe Lösungsmengen (max. 0,35 ml) in die Kultur eingebracht zu werden brauchten. Kontrollkulturen wurden jeweils mit einer gleichen Menge Lösungsmittel angesetzt. Die Behandlungsdauer betrug bei gleichzeitiger Einwirkung von Trenimon und Vitamin C 24 Stunden, bei Vitamin C Vorbehandlung 24 Stunden für Trenimon und 30 bzw. 48 Stunden für Vitamin C. Die Substanzen wurden jeweils in diesen Zeitabständen vor Kulturrende zugegeben und bis zur Aufbereitung darin belassen.

Die mit BrDU behandelten Kulturen weisen folgende Besonderheiten auf: Als Konzentrationen wurden bei Trenimon 2×10^{-8} Mol/l und bei Vitamin C 5×10^{-4} Mol/l verwendet; die Behandlungsdauer wurde in allen Versuchen auf 24 Stunden festgesetzt. Die Einwirkungszeit von Bromdesoxyuridin (Endkonzentration $2,2 \times 10^{-5}$ Mol/l) betrug bei den Teststufen 72 bzw. 24 Stunden. Diese beiden Zeiten wurden gewählt, um die Reaktionen verschieden schnell proliferierender Zellen auf die Einwirkung von Vitamin C und Trenimon zu erfassen. Um eine Photolyse der BrDU-substituierten DNA zu vermeiden, wurden die Kulturen im Dunkeln gehalten.

2.3. Zytogenetische Auswertung

Für jede Teststufe wurden nach Möglichkeit 150 gut analysierbare Metaphaseplatten aus zwei Parallelkulturen zur Auswertung herangezogen. Alle Versuche wurden dabei mindestens einmal mit dem Blut eines anderen Spenders wiederholt. Bei ca. 1250-facher Vergrößerung wurden die Metaphaseplatten in erster Linie auf Chromatid- und Isochromatid-Gaps, Chromatid- und Isochromatid-Brüche sowie auf Austauschfiguren lichtmikroskopisch untersucht. Der Mitoseindex (= Anteil der in Teilung befindlichen an der Gesamtzahl der vorhandenen Zellen) wurde bei allen Teststufen aus 2000 Zellen ermittelt.

Der in einigen Abbildungen verwendete Reduktionsfaktor (RF) stellt den Quotienten aus dem entsprechenden Aberrationswert unter Einfluß von Trenimon und Vitamin C und dem Aberrationswert unter Einfluß von Trenimon allein dar (GEBHART 1972) und veranschaulicht das Ausmaß eines potentiellen Protektoreffektes. Die Zahl der durch Trenimon allein induzierten Aberrationen wird dabei durch die 1,0 Linie repräsentiert.

Bei den Versuchsansätzen mit BrDU wurden pro Teststufe 2000 Zellkerne aus zwei Parallelkulturen bei 500-facher

Vergrößerung mikroskopisch untersucht. Die Färbung mit Giemsa ist bei BrDU-substituiertem Chromatin weniger intensiv als bei nicht substituiertem. Während sich einfach markierte Chromosomen von unmarkierten nicht sichtbar in der Helligkeit unterscheiden, besteht zwischen einfach und doppelt markierten Chromatiden ein deutlicher Helligkeitskontrast, so daß man auch die Zellkerne (Abb. 5) aufgrund ihrer unterschiedlichen Anfärbung klassifizieren kann (vgl. HERRMANN 1979):

- 1) dunkel gefärbte Kerne: Zellkerne in den Phasen G_1 und G_2 des ersten Zellzyklus in Gegenwart von BrDU (G_{1I} und G_{2I}) und Zellkerne in der G_1 -Phase des zweiten Zellzyklus in Gegenwart von BrDU (G_{1II})
- 2) Kerne, die sich durch nebeneinander vorkommende dunkel und hell gefärbte Areale auszeichnen: S-Phasen Kerne im ersten, zweiten und dritten Zellzyklus in Gegenwart von BrDU (SI, SII, SIII)
- 3) hell gefärbte Kerne: Interphase-Kerne im zweiten und dritten Zellzyklus in Gegenwart von BrDU (G_{2II} , G_{1III} , G_{2III}).

Bei ca. 1250-facher Vergrößerung wurden aus jeder Teststufe 200 (einmal nur 165) Metaphaseplatten auf Differenzierung der Chromosomen (Abb. 6) untersucht und in den Tabellen 5a und 5b als Anteil der differenzierten Metaphasen an der Gesamtzahl der Mitosen in Prozenten angegeben. Vollständig differenzierte Metaphasen treten dann auf, wenn sich die proliferierenden Zellen gerade in der zweiten Metaphase nach 24- bzw. 72-stündiger BrDU-Einwirkung befinden. Die Zahlenreihen in den Tabellen 5a und 5b entsprechen Versuchen mit dem Blut von 2 verschiedenen Spendern aus je 2 Parallelkulturen.

3. Ergebnisse

3.1. Zytogenetische Aktivität von Trenimon und Vitamin C

Bereits in früheren Untersuchungen (HAMPEL 1968; GEBHART 1970; BECHER und GEBHART 1973; STOSIEK und GEBHART 1974) wurde die zytogenetische Aktivität des trifunktionellen Äthylenimin-Derivats Trenimon eingehend analysiert. Das Agens induzierte bei der hier verwendeten Konzentration von 10^{-7} Mol/l zahlreiche chromosomale Strukturdefekte, wie Chromatid- und Isochromatid-Gaps, Chromatid- und Isochromatid-Brüche. Letztere hatten die Entstehung von azentrischen Fragmenten zur Folge. Außerdem waren Chromatid-Translokationen zu beobachten, dizentrische und auffällige atypische Chromosomen sowie partielle Endoreduplikationen fanden sich sehr selten. Die qualitativen Ergebnisse stimmen somit gut mit den oben genannten früheren Untersuchungen überein. Auch die quantitativen Resultate zeigen eine relativ hohe Koinzidenz mit einer vergleichbaren Untersuchung von GEBHART und BECHER (1976). Dort liegen allerdings die Werte für Bruchereignisse pro Metaphase und Isochromatid-Aberrationen etwas höher als in der vorliegenden Studie.

Vitamin C ließ bei einer Konzentration von 10^{-3} Mol/l in den Kontrollkulturen nur eine sehr geringe zytogenetische Aktivität erkennen. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, liegen die beobachteten Aberrationsraten für Vitamin C im Bereich der Null-Kontrolle. Lediglich bei längerer Einwirkung der Ascorbinsäure stiegen die Werte schwach an, wie aus Tab. 1 und Tab. 2 zu erkennen ist.

3.2. Dosisabhängigkeit des Effektes von Vitamin C bei gleichzeitiger Einwirkung von Trenimon

Die Dosisabhängigkeit der modifizierenden Wirkung von Vitamin C wurde bei einer Trenimonkonzentration von 10^{-7} Mol/l geprüft. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 1 und Abb. 2 dargestellt. Da in der Testreihe I

bereits die in der Null-Kontrolle beobachteten Aberrationswerte auffallend über der Norm lagen und diese auch in den übrigen Teststufen deutlich gegenüber den Werten der Versuchsreihen II und III erhöht waren, konnten lediglich letztere rechnerisch zusammengefaßt und gemeinsam besprochen werden.

Bei Betrachtung des prozentualen Anteils von Metaphasen mit Aberrationen konnte in Reihe I keine nennenswerte Änderung unter dem Einfluß der verschiedenen Vitamin C-Konzentrationen gegenüber der nur mit Trenimon behandelten Kultur festgestellt werden. In den Versuchen II und III ergab sich allenfalls bei den Konzentrationsstufen 5×10^{-4} Mol/l und 10^{-4} Mol/l eine geringfügige Reduktion (RF 0,85 und 0,87).

Der prozentuale Anteil von Metaphasen mit Bruchereignissen wurde in der Versuchsreihe I nur geringfügig beeinflusst, während in den Reihen II und III eine merkliche Reduktion bei den Vitamin C-Konzentrationen 5×10^{-4} Mol/l und 10^{-4} Mol/l (RF 0,76; 0,71) beobachtet wurde.

Wie Abb. 2c zeigt, war bei den Achromasien pro Metaphase ein merklicher Protektoreffekt festzustellen, der aber keine klare Dosisabhängigkeit erkennen ließ. Bei der höchsten Vitamin C-Konzentration stieg jedoch die Gap-Rate über die der Trenimonkontrolle (RF 1,1). In Versuch I konnte nur bei einer Vitamin C-Konzentration von 10^{-4} Mol/l eine deutliche Reduktion beobachtet werden (RF 0,73).

Obwohl bei der höchsten Vitamin C-Konzentration keine nennenswerte Verminderung der Bruchrate zu bemerken war, zeigte sich bei den übrigen Teststufen eine meist auch im Vergleich zu der Gap-Rate wesentlich deutlichere Abnahme (RF 0,67/0,60/0,57 und 0,96). In Versuch I lagen dagegen die Reduktionsfaktoren zwischen 0,68 und 0,87 bei einer unklaren Dosis-Effekt-Beziehung.

Die Reduktionsfaktoren der verschiedenen Aberrationstypen sind aus den Abb. 2a und 2b zu ersehen. Es ergab sich mit Ausnahme der höchsten Vitamin C-Konzentration in allen Fällen ein deutlicher Schutzeffekt, jedoch keine klare Dosisabhängigkeit. Bei den Gaps wurden die Isochromatid-Aberrationen in stärkerem Maße reduziert als die Chromatid-Aberrationen, während bei den Brüchen diesbezüglich ein entgegengesetztes Verhalten zu beobachten war. Austauschereignisse wurden am deutlichsten bei einer Vitamin C-Konzentration von 5×10^{-5} Mol/l vermindert (RF 0,42), stiegen jedoch mit zunehmender Konzentration wieder an. Bemerkenswert erscheinen bei der Vitamin C-Konzentration von 10^{-3} Mol/l die hohen Werte aller Aberrationstypen.

3.3. Effekt bei verlängerter Einwirkung von Vitamin C

Zur Klärung einer potentiellen zellzyklusspezifischen Wirksamkeit des Vitamin C, vor allem aber, um festzustellen, ob das Agens in der Lage ist, die Chromosomenstruktur durch eine Prophylaxe zu stabilisieren, wurden an dem Modell Trenimon 10^{-7} Mol/l / Vitamin C 10^{-3} Mol/l die Effekte einer 48- bzw. 30-stündigen Behandlung mit dem Anticlastogen untersucht; dies entspricht einer Vorbehandlung von 24 bzw. 6 Stunden.

Wie aus Tab. 2 zu ersehen ist, wurde der Anteil von Metaphasen mit Aberrationen bzw. Brüchen nicht nennenswert vermindert. Hingegen nahm die Zahl der Brüche pro Metaphase in beiden Zeitstufen deutlich (RF 0,72; 0,69) gegenüber der Trenimonkontrolle ab, wie Abb. 3 zeigt. Bei den Gaps pro Metaphase war dieser Effekt nur schwach ausgeprägt (RF 0,8; 0,88), im Vergleich zur entsprechenden gleichzeitigen Behandlung (siehe Tab. 1) aber doch bemerkenswert.

Die zahlenmäßige Analyse der auftretenden Einzeldefekte erbrachte in beiden Teststufen eine deutliche Abnahme der Zahlen von Isochromatid-Gaps, Chromatid-Brüchen und Austauschfiguren; bei den Isochromatid-Brüchen konnte

ein klarer Protektoreffekt nur bei 48-stündiger Behandlung gefunden werden.

Auch in diesem Versuch wurden bei den Gaps die Isochromatid-Aberrationen in stärkerem Maße verringert als die Chromatid-Aberrationen, während bei den Brüchen diesbezüglich im Mittel ein entgegengesetztes Verhalten zu beobachten war.

3.4. Verteilungsmuster von Metaphasen mit einer bestimmten Anzahl von Gaps, Brüchen oder Aberrationen

Da bei der zytogenetischen Auswertung der Metaphasen hinsichtlich der Aberrationszahl pro Zelle ein breites Spektrum beobachtet wurde, erschien es wichtig, den prozentualen Anteil von Zellen mit einer bestimmten Anzahl von Achromasien, Brüchen oder Defekten in jeder Kultur zu ermitteln. Von Interesse war vor allem aber die Frage, wie das durch Trenimon induzierte Verteilungsmuster von Zellen mit unterschiedlicher Anzahl von Aberrationen durch Vitamin C in den einzelnen Teststufen verändert wird.

In Abb. 4a kommt zum Ausdruck, daß der Anteil von Zellen ohne Strukturdefekte bei den mit kombinierter Einwirkung von Trenimon und Vitamin C behandelten Kulturen meist deutlich höher ist als bei der Trenimonkontrolle. Dabei heben sich die Werte der Vitamin C-Konzentrationen 5×10^{-4} Mol/l und 10^{-4} Mol/l (Säule 5 und 6) der Spalten II und III besonders ab. Dagegen liegen die in Säule 4 dargestellten Prozentzahlen stets unter denen der mit Trenimon behandelten Kontrollkultur.

Zellen mit einem Gap (Abb. 4b) sind in allen Teststufen etwa gleich häufig, während Metaphasen mit einem Bruchereignis oder allgemein einer Aberration bei zusätzlich mit Vitamin C behandelten Kulturen in der Regel öfter vorkommen.

Abb. 4c zeigt, daß nach Einwirkung der drei niedrigsten Vitamin C-Konzentrationen die Werte für Gaps und Brüche im Vergleich mit der Trenimonkontrolle niedriger, für Defekte allgemein etwa gleich hoch liegen. In den übrigen Teststufen ergeben sich gegenüber der Säule 1 nur bei dem Anteil der Metaphasen mit Aberrationen leichte Abweichungen der Werte nach oben.

Der Anteil von Zellen mit drei und mehr Gaps, Brüchen oder Aberrationen ist bei den mit Vitamin C behandelten Kulturen in der Regel deutlich niedriger als in der Trenimonvergleichskultur. Nur in Teststufe 4 liegen die Werte in Nähe der Trenimonkontrolle (Abb. 4d). Eine klare Dosisabhängigkeit des Verteilungsmusters konnte damit in keinem Fall festgestellt werden.

3.5. Beeinflussung des Mitoseindex

Um Hinweise auf eventuelle Änderungen der Proliferationsaktivität zu erhalten, wurde bei jeder Teststufe der Mitoseindex bestimmt. In den Tab. 3 und 4 fällt ein deutlicher Rückgang der Mitoseindices aller mit Trenimon behandelten Kulturen gegenüber der Null-Kontrolle auf. Dabei konnte im Mittel weder bei gleichzeitiger Behandlung noch bei Vorbehandlung mit Vitamin C eine nennenswerte Veränderung gegenüber der Trenimonkontrolle festgestellt werden. In den Vitamin C-Kontrollkulturen lag der Mitoseindex im Durchschnitt um 23,4 % unter jenem der Null-Kontrolle.

3.6. 5-Bromdesoxyuridin (BrDU)-Versuche

Bei 24-stündiger Behandlung der Kulturen mit BrDU zeigte sich in allen Teststufen etwa dieselbe Verteilung (siehe Tab. 5a) von "dunklen", "hellen" und S-Phasen-Kernen (Abb. 5). Unterschiede ergaben sich für die Werte der Mitoseindices: Die Null-Kontrolle hatte mit 27 Mitosen pro 1000 Kerne den höchsten Index; etwas niedriger lagen

die Werte der Vitamin C-Kontrolle und der Kultur mit Vitamin C und Trenimon. Der Mitoseindex der Trenimonkultur lag um 52,8 % unter dem der Null-Kontrolle.

Bemerkenswert ist der Anteil der differenzierten Mitosen an der Gesamtzahl der Mitosen. Er liegt bei der Null-Kontrolle am höchsten; in deutlichem Abstand folgt der Wert für die Vitamin C-Kontrolle. Niedrig liegen die Anteile für die Trenimonkultur und für den Versuch mit Trenimon und Vitamin C, der mit 0,25 % den geringsten Wert aufweist.

Eine 72-stündige Behandlung der Kulturen mit BrDU erbrachte bezüglich der Anteile von "dunklen" und "hellen" Kernen eine Verminderung bei der Trenimonkontrolle gegenüber den anderen Testkulturen. Der Anteil der S-Phasen-Kerne war nur geringen Schwankungen unterworfen, wie Tab. 5b zeigt. Die Mitoseindices waren größenordnungsmäßig in den einzelnen Teststufen ähnlich wie bei den Kulturen mit 24-stündiger BrDU-Behandlung. Der prozentuale Anteil der differenzierten Mitosen an der Gesamtzahl der Mitosen lag bei der Null-Kontrolle mit 66,5 % am höchsten. Es folgten die Werte für die Vitamin C-Kontrolle, die Kultur mit Vitamin C und Trenimon sowie die Trenimonkontrolle. Bei letzterer lag der Anteil der differenzierten Mitosen um 40,5 % niedriger als bei der Null-Kontrolle.

4. Diskussion

4.1. Wertung der Befunde

Die zusammenfassende Betrachtung der dargestellten Ergebnisse kennzeichnet die modifizierende Wirkung von Vitamin C als Schutzwirkung gegenüber der Aberrationsauslösung durch das trifunktionelle Alkylans Trenimon bei menschlichen Chromosomen. Bisher konnte ein Protektoreffekt von Vitamin C gegen die mutagene Aktivität von energiereichen Strahlen an pflanzlichem Zellmaterial (BARTHELMESS et al. 1965/1968 und CONGER 1975) nachgewiesen werden. Über eine entsprechende Wirksamkeit von Ascorbinsäure gegenüber chemischen Clastogenen berichten SHAMBERGER et al. 1973 und GUTTENPLAN 1977.

Aufschlußreich ist ein Effektivitätsvergleich von Vitamin C mit den SH-tragenden Verbindungen L-Cystein und Cysteamin, da es sich hierbei ebenfalls um natürliche Schutzstoffe handelt, die bereits unter ähnlichen Versuchsbedingungen getestet wurden (GEBHART 1972; GEBHART und BECHER 1976). Danach ist Ascorbinsäure in einer Konzentration von 10^{-4} Mol/l als Protektor effektiver als Cysteamin und L-Cystein, wenn man die Bruchrate pro Metaphase betrachtet. Auch bei einer Vorbehandlung der Lymphozyten mit Vitamin C war dieses wirksamer als L-Cystein.

Bei gleichzeitiger Behandlung der Kulturen mit Trenimon und Vitamin C wurde - mit Ausnahme von dessen höchster Konzentration - die Rate aller durch das Alkylans ausgelösten Chromosomenaberrationen deutlich durch Ascorbinsäure vermindert. Insgesamt gesehen wurden bei fast allen Konzentrationen die Brüche pro Metaphase stärker reduziert als die Gaps pro Metaphase. Bei einer Vitamin C-Konzentration von 10^{-3} Mol/l konnte dagegen keine nennenswerte Verminderung der durch Trenimon induzierten Aberrationsraten, mit Ausnahme der Translokationsrate festgestellt werden; die Zahl der Chromatid-Gaps

und Isochromatid-Brüche stieg in diesem Fall sogar gegenüber den Kontrollwerten an. Über einen fördernden Einfluß von Ascorbinsäure auf die Induktion von DNS-Strangbrüchen bei E.coli durch Bleomycin berichten auch ISHIDA und TAKAHASHI 1975. Eine klare Dosis-Effekt-Beziehung konnte damit in der vorliegenden Studie für Vitamin C nicht festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen, die bei gleichzeitiger Einwirkung von Vitamin C und Trenimon gemacht wurden, ließ Vitamin C in einer Konzentration von 10^{-3} Mol/l bei einer 6- bzw. 24-stündigen Vorbehandlung eine Schutzwirkung erkennen. Ob ein solcher Effekt auf einer stabilen Anreicherung von Vitamin C in der Zelle beruhen kann und ob eine durch Ascorbinsäure hervorgerufene Veränderung intrazellulärer Strukturen eine Beziehung zu dem beobachteten Schutzeffekt hat, müßte durch weitere, vor allem biochemische Untersuchungen geklärt werden. Zum Beispiel berichtet EDGAR 1974, daß Ascorbinsäuremangel an Fibroblasten von Meerschweinchen sich durch eine merklich geringere Ausdehnung des rauen Endoplasmatischen Reticulums und Veränderungen der Zahl und Lage der Ribosomen bemerkbar macht. Nach einer Behandlung mit Vitamin C konnten diese Anomalien in einem Zeitraum von 4 bis 24 Stunden eine Rückbildung erfahren. Wenigstens in einigen Fällen, so stellt EDGAR fest, seien die oben genannten Strukturänderungen bei Ascorbinsäuremangel eine typische Begleitreaktion von Carcinogenen, die den intrazellulären Vitamin C-Spiegel rasch senken.

Ein Vergleich der Aberrationsraten bei den Vitamin C-Kontrollkulturen (10^{-3} Mol/l) mit denjenigen der Null-Kontrollen zeigt eine geringfügige Steigerung bei den Kulturen mit 6- bzw. 24-stündiger Vitamin C-Vorbehandlung an. Offensichtlich erhöht Ascorbinsäure in einer Konzentration von 10^{-3} Mol/l bei einer Einwirkungsdauer von mehr als 24 Stunden den prozentualen Anteil der Metaphasen mit Aberrationen und bewirkt somit Veränderun-

gen an der DNS. Eine entsprechende Wirkung von Ascorbinsäure, vor allem in Gegenwart von O_2 oder Cu^{2+} beobachteten auch ANDOH et al. 1972, MORGAN et al. 1976, YAMAFUJI et al. 1971 und STICH et al. 1976 an verschiedenen Testsystemen.

Die Mitoseindices aller Vitamin C-Kontrollen liegen niedriger als diejenigen der Null-Kontrollen. Es tritt also bei einer Vitamin C-Konzentration von 10^{-3} Mol/l in den Lymphozytenkulturen bereits ein leicht zytotoxischer Effekt auf. Zwar stellt die Bestimmung der Mitoseindices eine relativ grobe Methode dar, doch finden auch FOGEL et al. 1975 in ihren Untersuchungen über die Wirkung von Ascorbinsäure auf menschliche Lymphozyten, daß Vitamin C in hohen Dosen den Mitoseindex gegenüber unbehandelten Kulturen senkt, in niedrigen Dosen aber erhöht. Danach darf man in der vorliegenden Studie bei einer Vitamin C-Konzentration 5×10^{-5} , 10^{-4} und 5×10^{-4} Mol/l zumindest mit keiner stärkeren Senkung der Mitoseindices als in den Kontrollversuchen mit 10^{-3} Mol/l rechnen.

Die BrDU-Markierung der DNS mit darauffolgender Färbung mit Giemsa (ZAKHAROV und EGOLINA 1972; KORENBERG und FREEDLENDER 1974; IKUSHIMA und WOLFF 1974; KIM 1974; DUTRILLAUX 1976) ist u.a. gut geeignet, Zellzyklusveränderungen durch Einwirkung verschiedener Stoffe zu kontrollieren (PERA und MATTIAS 1976; PERA et al. 1977). Eine relativ unkomplizierte Methode zeigte HERRMANN 1979 auf. Bei Anwendung dieser Technik in der vorliegenden Studie zeigten Lymphozytenkulturen, die 24 Stunden mit BrDU behandelt wurden, in allen Teststufen etwa dieselbe Verteilung der differenzierten Kernklassen. Daraus kann geschlossen werden, daß unter Einwirkung der Testsubstanzen keine sehr starke Beschleunigung oder Verzögerung des Zellzyklus im Vergleich zur Null-Kontrolle eintritt. Eine Vortäuschung des Schutzeffektes von Vitamin C durch selektive Mechanismen ist also nicht sehr wahrscheinlich.

Daß aber eine gewisse Veränderung des Zellzyklus unter dem Einfluß der Testsubstanzen eingetreten ist, ergibt sich aus den Befunden über den Anteil der differenzierten Metaphasen unter Einwirkung von BrDU. Dabei zeigt sich eine Hemmung des Zellzyklus bei den schneller proliferierenden Zellen, deren Nachweis schon nach 24-stündiger BrDU-Einwirkung gelingt, wesentlich deutlicher als bei den langsamer proliferierenden Zellen, die sich nach 72-stündiger BrDU-Behandlung erst in der zweiten Metaphase befinden. Die schnell proliferierende Lymphozyten-Subpopulation (GEBHART 1978) reagiert demnach offenbar erheblich empfindlicher auf die Einwirkung der Testsubstanzen als die langsam proliferierende Lymphozyten-Population.

Das Auftreten von einigen vollständig differenzierten Metaphasen bereits 24 Stunden nach BrDU-Zugabe beweist, daß sich verschiedene Lymphozyten zu dieser Zeit am Ende des zweiten Zellzyklus in Gegenwart von BrDU befinden müssen (CROSSEN 1977). Ein repräsentatives Bild der tatsächlichen Chromosomenaberrationsrate kann man nur von Metaphasen erhalten, die sich in der ersten Teilung nach Agenseinwirkung befinden (KIHLMANN 1966; RIEGER und MICHAELIS 1967), da bei weiteren Teilungen von Zellen mit Chromosomendefekten die ursprüngliche Aberrationsrate durch Reduplikation, aber auch selektive Faktoren verfälscht werden würde. Die relativ lange Einwirkungsdauer der Testsubstanzen müßte deshalb unter diesem Aspekt neu überdacht und bei künftigen Untersuchungen eventuell verkürzt werden.

4.2. Biochemische Aktivität der Testsubstanzen und Wirkungsmechanismen

Die biochemische Wirksamkeit des trifunktionellen Äthyleniminderivates Trenimon ist durch seine alkylierende Eigenschaft gekennzeichnet. Dadurch bewirkte Umbauprozesse am Nukleoprotein scheinen hinsichtlich der zytogenetischen

Aktivität als wichtigste Reaktionen eine Rolle zu spielen (RÖHRBORN 1970). Es ist bekannt, daß Trenimon ferner eine Senkung des ATP-Spiegels als Folge einer deutlichen Glycolysehemmung induziert. Als Ursache dafür dürfte eine intrazelluläre Abnahme von NAD anzusehen sein (BAYER Trenimonprospekt 1971). Untersuchungen von GRUNICKE 1971 an Ehrlich-Ascites-Tumorzellen zeigten, daß Trenimon sowohl eine Hemmung der NAD-Synthese als auch einen beschleunigten NAD-Abbau bewirkt. Ferner konnte dieser Autor eine Änderung der Matrizenaktivität des Chromatins im RNS-Polymerase-System durch Trenimon feststellen. Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, ist eine Modifizierung der zytogenetischen Aktivität von Trenimon in Lymphozytenkulturen durch Vitamin C möglich. Dabei waren sowohl die Einwirkungsdauer als auch die Konzentration des Modifikators von Bedeutung.

Auch wenn eine zytogenetische Untersuchung dieser Art kaum Aussagen über genaue Wirkungsmechanismen zuläßt, erscheint es sinnvoll, einige biochemische Grundüberlegungen anzustellen. Ascorbinsäure stellt ein biochemisches Redoxsystem mit einer Endiol-Gruppierung dar und dient bei Hydroxylierungen als Wasserstoffdonator. Bei physiologischem pH liegt Ascorbinsäure (pKs 4,2) hauptsächlich als Anion vor und ist deshalb für eine Alkylierung besonders empfänglich. Die dabei eingegangene Bindung ist relativ stabil in bezug auf eine hydrolytische Spaltung. Eine Alkylierung der Ascorbinsäure könnte deshalb durchaus wirkungsvoll mit einer Alkylierung anderer nucleophiler Stellen, z.B. an Nucleinsäuren oder Proteinen konkurrieren (EDGAR 1974). Als Mechanismus für die Reduzierung der clastogenen Aktivität der N-Nitroso-Verbindungen nimmt man mit ziemlicher Sicherheit eine Reduktion durch Vitamin C an (GUTTENPLAN 1977).

Prinzipiell könnten die oben aufgeführten Reaktionen zwischen dem aberrationsauslösenden Stoff und dem Protektor bereits in der Versuchslösung zu einer gegensei-

tigen Inaktivierung führen, doch spricht eine Reihe von gesicherten Befunden dagegen: Der Überschuß des Protektors gegenüber dem Testclastogen bewegte sich in der Größenordnung von zwei bis drei Zehnerpotenzen, wobei nie ein absoluter Effekt im Sinne einer Reduktion der Aberrationsrate auf das Niveau der Null-Kontrolle eintrat (vgl. GEBHART 1969/70/71/72/73; BECHER und GEBHART 1973). Auch die Feststellung, daß der mitosehemmende Effekt des Alkylans durch Vitamin C nur unbedeutend verändert wurde, spricht gegen eine direkte Reaktion schon in der Versuchslösung zwischen Clastogen und Anticlastogen und für eine intrazelluläre Schutzreaktion.

4.3. Schlußfolgerungen

Die zunehmende Anreicherung unserer Biosphäre mit chemischen Schadstoffen bedingt eine Gefährdung des menschlichen Erbgutes. Die Mutageneseforschung hat mit ihren zytogenetischen Untersuchungsmethoden bereits viele dieser Substanzen als chromosomenschädigend erkannt. Eine vollständige Eliminierung solcher Stoffe aus unserer Umwelt erscheint unmöglich, da manche, z.B. in der Krebstherapie, noch unersetzlich sind und ständig neue Chemikalien in den Lebensraum des Menschen eingebracht werden.

Einige prophylaktisch und therapeutisch einsetzbare Chemoprotektoren sind bereits durch frühere Untersuchungen bekannt. Auch die vorliegende Studie zeigt, daß ein Schutz gegenüber der Wirkung chromosomenschädigender Substanzen durch einen natürlich vorkommenden Stoff möglich ist. Wichtige Forderungen, die aus klinischer Sicht an einen Protektor gestellt werden müssen, sind neben einer guten Verträglichkeit eine hohe Effektivität und ein breites Wirkungsspektrum. Ascorbinsäure erfüllt dabei in den durchgeführten in vitro Tests diese Bedingungen zu einem hohen Grad. Das in allen tierischen und pflanzlichen Zellen vorkommende Vitamin hat den großen Vorteil, daß es im menschlichen Organismus praktisch keine uner-

wünschten Nebenwirkungen erzeugt und ein Überschuß rasch wieder über die Nieren aus dem Körper eliminiert wird (KARLSON 1974).

Inwiefern Vitamin C seine Wirkung als Chemoprotektor auch in vivo entfaltet, müßte vor einer prophylaktischen Anwendung jedoch noch durch entsprechende Tests eingehend überprüft werden. Bei einer Zytostatikatherapie z.B. wäre auch zu untersuchen, ob deren klinischer Effekt in vivo durch Ascorbinsäure in irgendeiner Weise beeinträchtigt wird. Sollte dies nicht der Fall sein, könnte sich der Protektor als hilfreicher Zusatz bei der zytostatischen Therapie von Tumoren erweisen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß von Vitamin C auf die chromosomenaberrationsauslösende (=clastogene) Aktivität des trifunktionellen Alkylans Trenimon an menschlichen Lymphozyten in vitro untersucht.

Bei einer gleichzeitigen Trenimon/Vitamin C Behandlung der Kulturen wurden vier Ascorbinsäurekonzentrationsstufen getestet, von denen drei eine deutliche Reduktion der chromosomenschädigenden Wirkung des Testclastogens erkennen ließen. Eine klare Korrelation zwischen der verwendeten Protektordosis und dem Protektoreffekt konnte dabei nicht festgestellt werden. Auch eine Vorbehandlung der Kulturen mit Vitamin C konnte die Aberrationsauslösung durch Trenimon deutlich verringern. Eine absolute Schutzwirkung war in keinem Fall zu beobachten.

Die zytogenetische Aktivität der Ascorbinsäure erwies sich als sehr gering. Die beobachteten Aberrationsraten für Vitamin C lagen meist im Bereich der Null-Kontrollen, während der Mitoseindex unter dem der Null-Kontrolle lag.

Versuche mit der BrDU-Markierung der DNS ließen unter Einwirkung der Testsubstanzen keine starke Veränderung des Zellzyklus im Vergleich zur Null-Kontrolle erkennen.

Die aus der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Ergebnisse wurden unter Einbeziehung möglicher biochemischer und zytogenetischer Wirkungsmechanismen diskutiert. Unter therapeutischen oder prophylaktischen Gesichtspunkten erscheint eine künftige Verwendung von Ascorbinsäure als Chemoprotektor möglich, doch muß die Wirksamkeit des Vitamins noch an in vivo Testsystemen ausreichend untersucht werden.

6. Tabellen und Abbildungen

Tab. 1: Zytogenetische Befunde nach gleichzeitiger Einwirkung von Trenimon (10^{-7} Mol/l) und Vitamin C in verschiedenen Konzentrationen auf Lymphozytenkulturen in vitro

Trenimonkonz. Mol/l		0	0	10^{-3}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}
Vitamin C-Konz. Mol/l		0	10^{-3}	0	5×10^{-5}	10^{-4}	5×10^{-4}	10^{-3}	10^{-3}
Ausgewertete Metaphasen	I	200	200	200	-	139	127	170	
	II	150	150	150	150	150	150	150	
	III	150	150	150	150	86	150	150	
Metaphasen mit Aberrationen %	I	23,5	14,0	87,0	-	82,73	84,25	88,23	
	II	5,95	3,3	66,65	64,6	51,95	57,95	71,3	
	III	3,95	7,95	59,95	57,3	61,63	50,60	66,65	
Metaphasen mit Brüchen %	I	11,0	4,5	66,0	-	58,99	70,08	60,59	
	II	3,3	0,65	45,95	45,30	29,95	35,30	51,95	
	III	2,0	4,65	41,95	33,3	33,72	31,3	47,30	
$\frac{G}{M}$	I	0,15	0,11	1,45	-	1,06	1,38	1,40	
	II	0,03	0,03	0,71	0,43	0,53	0,49	0,77	
	III	0,02	0,03	0,67	0,47	0,64	0,48	0,76	
$\frac{B}{M}$	I	0,14	0,04	1,67	-	1,14	1,45	1,29	
	II	0,03	0,00	0,95	0,69	0,53	0,54	0,92	
	III	0,02	0,06	0,85	0,52	0,58	0,49	0,81	

Tab. 2: Zytogenetische Befunde nach Zugabe des Vitamin C (10^{-3} Mol/l) 24 bzw. 6 Stunden vor der Trenimonbehandlung (10^{-7} Mol/l)

Trenimkonz. Mol/l (24 h Behandlungsdauer)		0		10^{-7}		10^{-7}		10^{-7}	
Vitamin C-Zugabe in Std. vor der Fixierung (Konz. 10^{-3} Mol/l)		48 h	30 h	0 h	48 h	30 h	30 h	30 h	30 h
Ausgewertete Metaphasen	II	150	150	150	150	150	150	150	150
	III	150	150	150	101	150	150	150	150
Metaphasen mit Aber- rationen %	II	7,95	5,95	66,65	62,65	59,30	59,30	59,30	59,30
	III	13,3	7,95	59,95	60,40	63,95	63,95	63,95	63,95
Metaphasen mit Brüchen %	II	2,60	4,00	45,95	42,00	35,30	35,30	35,30	35,30
	III	4,65	4,65	41,95	39,60	42,60	42,60	42,60	42,60
$\frac{G}{M}$	II	0,05	0,01	0,71	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58
	III	0,10	0,04	0,67	0,51	0,64	0,64	0,64	0,64
$\frac{B}{M}$	II	0,02	0,04	0,95	0,64	0,51	0,51	0,51	0,51
	III	0,06	0,05	0,85	0,66	0,74	0,74	0,74	0,74

Tab. 2: Mitoseindizes nach gleichzeitiger Einwirkung von Trenimon (10^{-7} Mol/l) und Vitamin C in verschiedenen Konzentrationen auf Lymphozytenkulturen in vitro

Trenimonkonz. Mol/l	0	0	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}
Vitamin C Konz. Mol/l	0	10^{-3}	0	$5 \cdot 10^{-5}$	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	10^{-3}
Mitoseindex in %	I	59,5	48	29	--	25	16,5	22
	II	68	38,5	39	33,5	27	24	31
	III	76	55	26,5	41	28,5	31,5	40,5
$\bar{X}$		67,83	47,17	31,5	37,25	26,83	24	31,17

Tab. 4: Mitoseindizes nach einer 24-stündigen Trenimonbehandlung (10^{-7} Mol/l) bei 24 bzw. 6-stündiger Vorbehandlung mit Vitamin C (10^{-3} Mol/l)

Trenimonkonz. Mol/l (24 h Behandlungsdauer)		0	0	10^{-7}	10^{-7}
Behandlungsdauer mit Vitamin C (Konz. 10^{-3} Mol/l)		48 h	30 h	48 h	30 h
Mitoseindex in %	II	52,5	48,5	38	25
	III	57,5	59	31,5	35,5
$\bar{X}$		55	53,75	34,75	30,25

Erläuterungen zu den Tabellen 3 und 4:

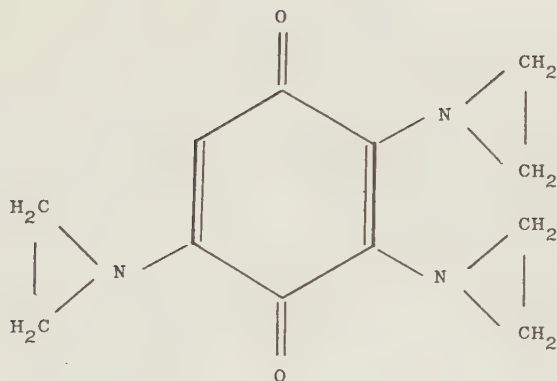
Die Einzelwerte der Reihen I - III wurden aus jeweils 2000 Kernen und Metaphasen ermittelt und auf 1000 Kerne und Metaphasen bezogen.

Tab. 5a: Kernklassen und Mitose-Index nach Einwirkung von BrDU ($2,2 \times 10^{-5}$ Mol/l) für die Dauer von 24 Stunden auf Lymphozytenkulturen mit 1) keinen Testsubstanzen = Null-Kontrolle, 2) Vitamin C 5×10^{-4} Mol/l, 3) Trenimon 2×10^{-8} Mol/l, 4) Trenimon 2×10^{-8} Mol/l + Vitamin C 5×10^{-4} Mol/l. Die Testsubstanzen 1 - 4 wirkten 24 Stunden ein (Zahlenangaben in %, soweit nicht anders angegeben)

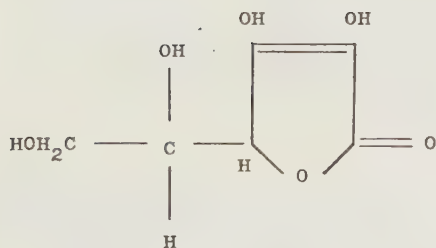
BrDU 24 h	dunkle Kerne	S-Phasen-Kerne	helle Kerne	Mitose Index	Anteil der differenzierten Mitosen an der Gesamtzahl der Mitosen (in %)
Null-Kontrolle	35 41	936,5 914	8 11,5	20,5 33,5	25,5 38,5
$\bar{x}$	38	925,25	9,75	27	32,0
Vitamin C 5×10^{-4} Mol/l	47,5 44,5	918 911,5	9,5 17,5	25 26,5	25,5 21,5
$\bar{x}$	46	919,75	13,5	25,75	23,5
Trenimon 2×10^{-8} Mol/l	48,5 35,5	921 945	13 11,5	17,5 8	6,5 4,5
$\bar{x}$	42	933	12,25	12,75	5,5
Trenimon 2×10^{-8} Mol/l + Vitamin C 5×10^{-4} Mol/l	41,5 48,5	923 913	10,5 15	25 23,5	0,5 0
$\bar{x}$	45	918	12,75	24,25	0,25

Tab. 5b: Kernklassen und Mitose-Index nach Einwirkung von BrDU ($2,2 \times 10^{-5}$ Mol/l) für die Dauer von 72 Stunden auf Lymphozytenkulturen mit 1) keinen Testsubstanzen = Null-Kontrolle, 2) Vitamin C 5×10^{-4} Mol/l, 3) Trenimon 2×10^{-8} Mol/l, 4) Trenimon 2×10^{-8} Mol/l + Vitamin C 5×10^{-4} Mol/l. Die Testsubstanzen 1 - 4 wirkten 24 Stunden ein. (Zahlenangaben in %, soweit nicht anders angegeben)

BrDU 72 h	dunkle Kerne	S-Phasen-Kerne	helle Kerne	Mitose Index	Anteil der differenzierten Mitosen an der Gesamtzahl der Mitosen (in %)
Null-Kontrolle	33 24	914,5 905,5	30,5 36,5	22 34	62,5 70,5
$\bar{x}$	28,5	910,0	33,5	28	66,5
Vitamin C 5×10^{-4} Mol/l	26 39	922,5 898	31 40	20,5 23	60 66,5
$\bar{x}$	32,5	910,25	35,5	21,75	63,25
Trenimon 2×10^{-8} Mol/l	17 25	947,5 926	28,5 24,5	7 24,5	40,6 38,5
$\bar{x}$	21	936,75	26,5	15,75	39,55
Trenimon 2×10^{-8} Mol/l + Vitamin C 5×10^{-4} Mol/l	31 25	915 918	36,5 33,5	17,5 23,5	54 50,5
$\bar{x}$	28	916,5	35	20,5	52,25



Trenimon (Bayer, Leverkusen)



L (+) Ascorbinsäure (Merck, Darmstadt)

Abb. 1: Testsubstanzen

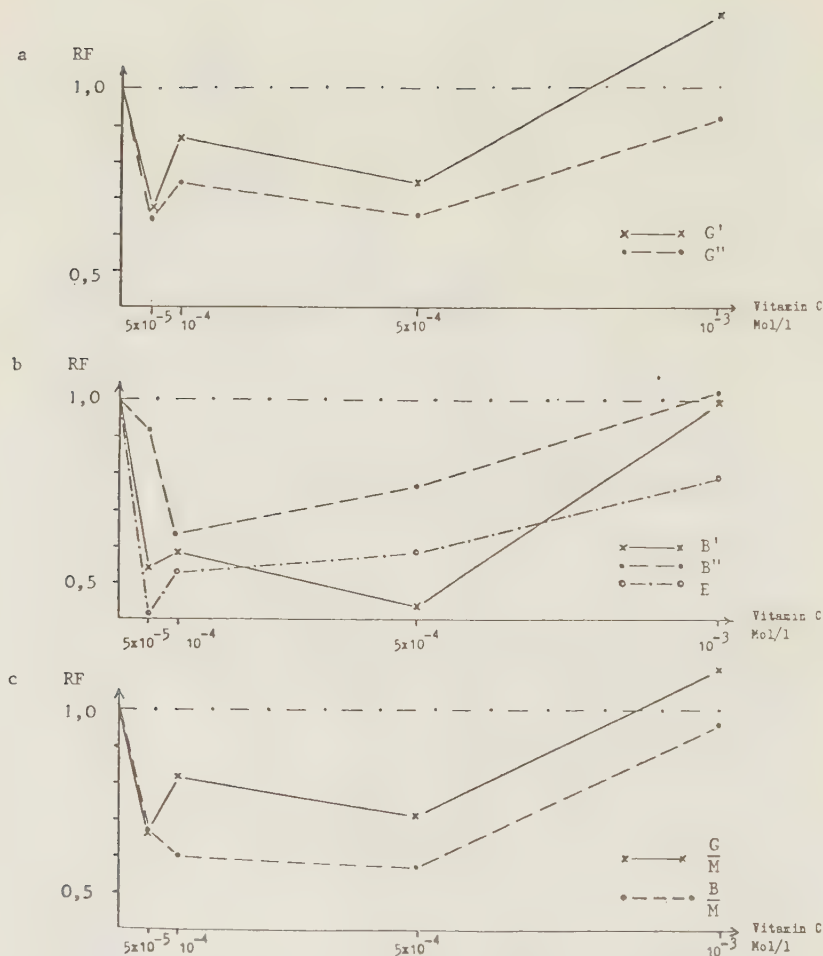
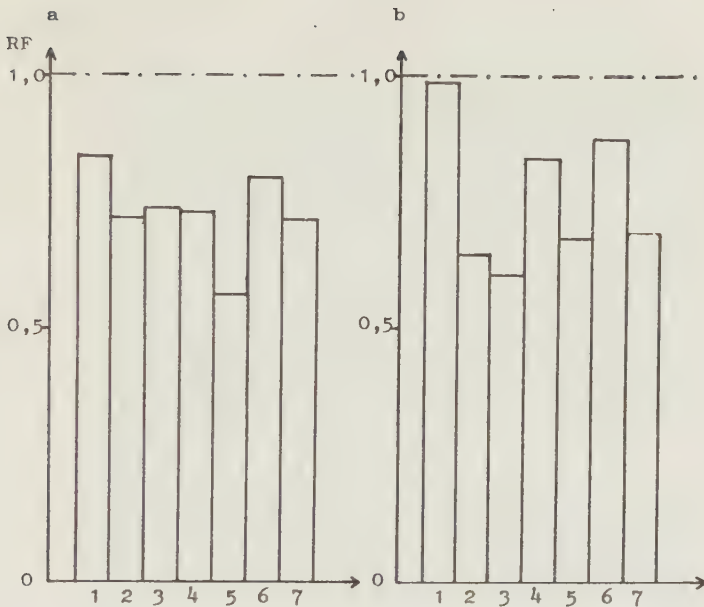


Abb. 2: Dosisabhängigkeit des Effektes von Vitamin C gegen die aberrationsauslösende Wirkung von Trenimon (10^{-7} Mol/l) bei gleichzeitiger Einwirkung (24 h). Berücksichtigt wurden die Versuche II und III (aus Tab. 1). Es bedeuten G' = Chromatid-Gaps; G'' = Isochromatid-Gaps; B' = Chromatid-Brüche; B'' = Isochromatid-Brüche; E = Austauschfolgen (Translokationen); $\frac{G}{M}$ = Gaps pro Metaphase; $\frac{B}{M}$ = Bruchereignisse pro Metaphase.



Säule: 1 = Zahl der Chromatid-Gaps
2 = Zahl der Isochromatid-Gaps
3 = Zahl der Chromatid-Brüche
4 = Zahl der Isochromatid-Brüche
5 = Zahl der Austauschfiguren
6 = Gaps pro Metaphase
7 = Bruchereignisse pro Metaphase

Abb. 3: Zeitabhängigkeit des Effektes von Vitamin C (10^{-3} Mol/l) gegen die aberrationsauslösende Wirkung von Trenimon (10^{-7} Mol/l)
Teilbild a: Trenimoneinwirkung 24 h; Vitamin C Zugabe 48 h vor Fixierung
Teilbild b: Trenimoneinwirkung 24 h; Vitamin C Zugabe 30 h vor Fixierung

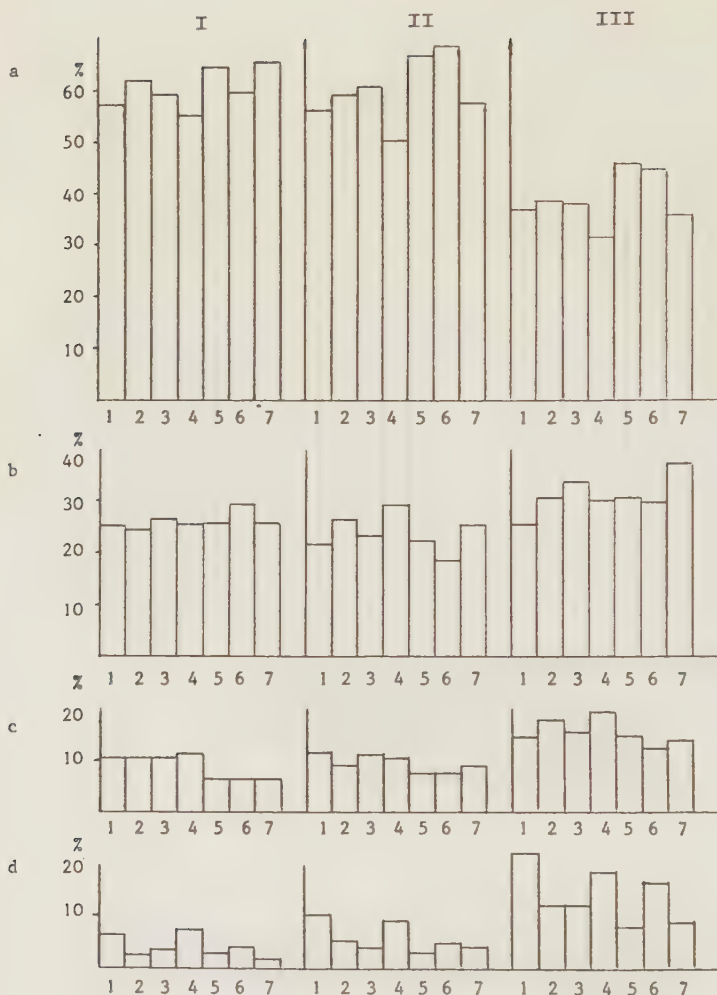


Abb. 4: Darstellung des prozentualen Anteils von Metaphasen mit einer bestimmten Anzahl von Gaps (incl. Isochromatid-Gaps), Brüchen (incl. Isochromatid-Brüchen und Austauschen) oder Aberrationen als Vergleich der einzelnen Teststufen

Erläuterungen zu der graphischen Darstellung Abb. 4:

es bedeuten:

- Teilbild a: Prozentualer Anteil der Metaphasen ohne Gap, ohne Bruch, ohne Aberration
 b: Prozentualer Anteil der Metaphasen mit einem Gap, Bruch oder einer Aberration
 c: Prozentualer Anteil der Metaphasen mit zwei Gaps, Brüchen bzw. Aberrationen
 d: Prozentualer Anteil der Metaphasen mit drei und mehr Gaps, Brüchen bzw. Aberrationen

Säule 1: Befund bei Trenimon-Einwirkung alleine (24 h; 10^{-7} Mol/l)

- | | | |
|-------------------------|----------------------------------|-----|
| 2: Befund bei Trenimon- | (24 h; 10^{-7} Mol/l) | und |
| Vitamin C-Einwirkung | (48 h; 10^{-3} Mol/l) | |
| 3: Befund bei Trenimon- | (24 h; 10^{-7} Mol/l) | und |
| Vitamin C-Einwirkung | (30 h; 10^{-3} Mol/l) | |
| 4: Befund bei Trenimon- | (24 h; 10^{-7} Mol/l) | und |
| Vitamin C-Einwirkung | (24 h; 10^{-3} Mol/l) | |
| 5: Befund bei Trenimon- | (24 h; 10^{-7} Mol/l) | und |
| Vitamin C-Einwirkung | (24 h; 5×10^{-4} Mol/l) | |
| 6: Befund bei Trenimon- | (24 h; 10^{-7} Mol/l) | und |
| Vitamin C-Einwirkung | (24 h; 10^{-4} Mol/l) | |
| 7: Befund bei Trenimon- | (24 h; 10^{-7} Mol/l) | und |
| Vitamin C-Einwirkung | (24 h; 5×10^{-5} Mol/l) | |

Spalte I: Werte für Gaps
 II: Werte für Brüche
 III: Werte für Aberrationen

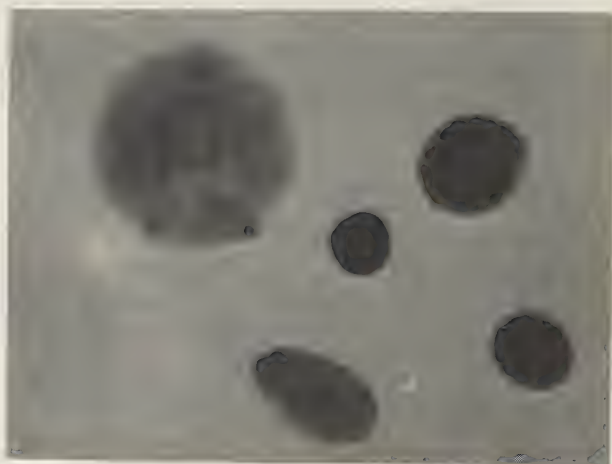
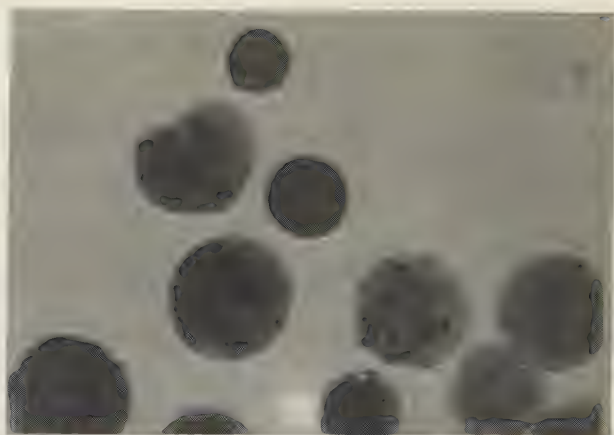


Abb. 5: Die ausgewerteten Kernklassen: dunkel gefärbte Kerne, S-Phase-Kerne (inkomogen gefärbt), hell gefärbte Kerne

a)



b)



Abb. 6: Chromatiddifferenzierte Metaphase (a); die Zelle befindet sich in der zweiten Metaphase nach BrDU-Einwirkung. Zum Vergleich eine nicht differenzierte Metaphase (b); die Chromatiden sind entweder gar nicht oder nur einmal mit BrDU markiert

7. Literatur

- ANDOH, T.; IDE, T.: Disulfide bridges in proteins linking DNA in cultured mouse fibroblasts, strain L · P3.
Exp. Cell Res. 74 (1972) 525 - 531
- AVANZI, S.: Inibizione dell'effetto citologico dell' acetato di Tallio per mezzo della cisteina.
Caryologia 10 (1957) 96 - 101
- AVANZI, S.: Chromosome breakage by pyrrolizidine alkaloids and modification of the effect with cysteine.
Caryologia 14 (1961) 251 - 261
- BACQ, Z.M.: Chemical protection against ionizing radiation.
Thomas, Springfield (1965)
- BARTHELMESS, A.; FÜRST, H.; HUBER, H.: Nahrungsbestandteile als natürliche Schutzstoffe gegen röntgeninduzierte Chromosomenschäden.
Die Naturwissenschaften 7 (1965) 160 - 161
- BARTHELMESS, A.; HUBER, H.; FÜRST, H.: Zytogenetische Untersuchungen über natürliche antimutagene Schutzstoffe für Strahlendiagnose, Strahlentherapie und berufliche Strahlenbelastung.
Strahlentherapie 136 (1968) 116 - 130
- BAYER: Trenimon-Prospekt (1971)
- BECHER, R.; GEBHART, E.: Die Schutzwirkung von Cysteamin und β -Aminoäthylmethylthiuronium (AET) gegen die chromosomenschädigende Aktivität von Trenimon in menschlichen Lymphocyten in vitro.
Humangenetik 17 (1973) 307 - 316.
- BONATI, F.; SAVINO, G.: Thiol compounds as protectors against X-rays and radiomimetic agents.
Progr. biochem. Pharmacol. 1 (1965) 489 - 500
- CONGER, B.V.: Radioprotective effects of ascorbic acid in barley seeds.
Radiation Botany 15 (1975) 39 - 48

- CROSSEN, P.E.; MORGAN, W.F.: Analysis of human lymphocyte cell time in culture measured by sister chromatid differential staining. Exp. Cell Res. 104 (1977) 453 - 457
- DUTRILLAUX, B.; FOSSE, A.M.: Utilisation du BrDU dans l'étude du cycle cellulaire des sujets normaux et anormaux. Ann. Génét. 19 (1976) 95 - 102
- EDGAR, J.A.: Ascorbic acid and biological alkylating agents. Nature 248 (1974) 136 - 138
- FOGEL, J.P.; SAMUELS, M.; SCHNEIDER, L.K.: The effects of ascorbic acid on human lymphocytes in vitro. Anatomical Record 181 (1975) 357
- GEBHART, E.: Die Wirkung von L-Cystein auf die chromatidbrechende Aktivität von 8-Hydroxychinolinsulfat. Protoplasma 65 (1968) 247 - 250
- GEBHART, E.: Zur Beeinflussung der Wirkung von Myleran auf menschliche Chromosomen durch L-Cystein. Mut. Res. 7 (1969) 254 - 257
- GEBHART, E.: Die Wirkung von L-Cystein auf die Aberrationsauslösung in menschlichen Chromosomen durch chemische Mutagene. I Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei Verwendung von Trenimon als Aberrationsinduktor. Humangenetik 10 (1970) 115 - 126
- GEBHART, E.: Die Wirkung von L-Cystein auf die Aberrationsauslösung in menschlichen Chromosomen durch chemische Mutagene. II Zur Bedeutung des Zeitfaktors bei Verwendung von Trenimon als Aberrationsinduktor. Humangenetik 11 (1971) 237 - 243
- GEBHART, E.: Untersuchungen über die Schutzwirkung einiger Radioprotektoren und Aminosäuren gegen die chromosomenschädigende Aktivität chemischer Mutagene in menschlichen Lymphocyten in vitro. Habilitationsschrift (1972)

- GEBHART, E.: Untersuchungen über die Beeinflussung der chromosomenschädigenden Aktivität von Trenimon an menschlichen Lymphocyten in vitro durch Aminosäuren. Humangenetik 18 (1973) 237 - 246
- GEBHART, E.; BECHER, R.: Comparative studies on the specificity of anticlastogenic action in human lymphocytes in culture. Hum. Genet. 32 (1976) 49 - 64
- GEBHART, E.: pers. Mitteilung (1978)
- GRUNICKE, H.: Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus alkylrierender Cytostatica. Mitt.-Dienst Ges. z. Bekämpfung d. Krebskrankh. 5 (1971) Heft 5 (1 - 94)
- GUTTENPLAN, J.B.: Inhibition by L-ascorbate of bacterial mutagenesis induced by two N-nitroso-compounds. Nature 268 (1977) 368 - 370
- HAMPEL, K.E.: Über die Wirkung von Zytostatika auf die Chromosomen des Menschen. Int. Z. Klin. Pharmakol. Therap. Toxikol. 1 (1968) 322 - 371
- HERRMANN, U.: Eine einfache Bromdesoxyuridin-Markierungsmethode zur Analyse des Zellzyklus und seiner Beeinflussung durch Chemicalien. Dissertation Erlangen (1979)
- IKUSHIMA, T.; WOLFF, S.: Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromdesoxyuridine and 5-iododeoxyuridine substituted chinese hamster chromosomes. Exp. Cell Res. 251 (1974) 70 - 72
- ISHIDA, R.; TAKAHASHI, T.: Increased DNA chain breakage by combined action of bleomycin and superoxide radical. Biochem. Biophysic. Res. Commun. Vol. 66 No. 4 (1975) 1432 - 1438
- KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1974)
- KAUL, B.L.: Modification of the radiomimetic effects of nitrosoguanidine by cysteine in plants. Experimenta 25 (1969) 74

- KIHLMANN, B.A.: Actions of chemicals on dividing cells.
Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey (1966)
- KIM, M.A.: Chromatidaustausch und Heterochromatinveränderungen menschlicher Chromosomen nach BrDU-Markierung.
Hum. Genet. 25 (1974) 179
- KORENBERG, J.R.; FREEDLENDER, E.F.: Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges.
Chromosoma 48 (1974) 355
- MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMANN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A.: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood.
Exp. Cell Res. 20 (1960) 613 - 616
- MORGAN, A.R.; CONE, R.L.; ELGERT, T.M.: The mechanism of DNA strand breakage by vitamin C and superoxide and the protective roles of catalase and superoxide dismutase.
Nucleic Acids Research 3 (5) (1976) 1139 - 1149
- PERA, F.; MATTIAS, P.: Labelling of DNA and differential sister chromatid staining after BrDU treatment in vivo.
Chromosoma 57 (1976) 13 - 18
- PERA, F.; MATTIAS, P.; DETZER, K.: Methods for determining the proliferation kinetics of cells by means of 5-bromodeoxyuridine.
Cell Tiss. Kinet. 10 (1977) 225 - 269
- RIEGER, R.; MICHAELIS, A.: Chromosomenmutationen.
Fischer, Jena (1967)
- RÖHRBORN, G.: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung. IV Zyklische N-Lostderivate.
Molec. Gen. Genetics 102 (1968) 50 - 68
- RÖHRBORN, G.: Biochemical mechanisms of mutation.
In: VOGEL, F. und RÖHRBORN, G. (Hrsg.): Chemical mutagenesis in mammals and man.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1970)

SHAMBERGER, R.J.; BAUGHMAN, F.F.; KALCHERT, S.L.; WILLIS, C.E.; HOFFMAN, G.C.: Carcinogen-induced chromosomal breakage decreased by antioxidants.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 70, Nr.5 (1973) 1461 - 1463

STICH, H.F.; KARIM, J.; KOROPATNICK, J.; LO, L.: Mutagenic action of ascorbic acid.
Nature 260 (1976) 722 - 724

STOSIEK, M.; GEBHART, E.: Protective effect of Reducdyn against the chromosome damaging activity of 2, 3, 5-triethyleneimine-benzochinone - 1,4 on human lymphocytes in vitro.
Humangenetik 25 (1974) 209 - 216

YAMAFUJI, K.; NAKAMURA, Y.; OMURA, H.; SOEDA, T.; GYOTOKU, K.: Antitumor potency of ascorbic, dehydroascorbic or 2, 3-diketogulonic acid and their action on deoxyribonucleic acid.
Z. Krebsforschung 76 (1971) 1 - 7

ZAKHAROV, A.F.; EGOLINA, N.A.: Differential spiralization along mitotic chromosomes. I. BrDU-revealed differentiation in chinese hamster chromosomes.
Chromosoma 38 (1972) 341 - 365

Herrn Professor Dr. G. Koch danke ich für den Arbeitsplatz im Institut für Humangenetik und Anthropologie.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. E. Gebhart für die Überlassung des Themas und seine stets gegebene Bereitschaft, durch Diskussion und Anregung den Fortgang der Arbeit zu fördern.

Für die sorgfältige technische Hilfe bedanke ich mich herzlich bei Frau L. Dietrich und Frl. I. Ottenberger.

An dieser Stelle danke ich auch meinen Eltern, die mir das gewünschte Studium ermöglichten und die Voraussetzungen für meine Ausbildung schufen.

Lebenslauf

Am 28.3.1954 wurde ich als zweiter Sohn des Studiendirektors Eberhard Grziwok und seiner Ehefrau Lotte Grziwok, geborene Urban, in Regensburg geboren. Dort besuchte ich von 1960 - 1964 die Volksschule und ab 1964 das Goethe-Gymnasium. Im Mai 1973 legte ich die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1973/74 begann ich an der Universität Düsseldorf das Studium der Medizin. Im Wintersemester 1974/75 und im Sommersemester 1975 studierte ich an der Universität Regensburg Medizin und bestand dort im August 1975 die ärztliche Vorprüfung. Ab Wintersemester 1975/76 setzte ich das Medizinstudium an der Universität Erlangen-Nürnberg fort und legte dort im August 1976 den ersten Abschnitt und im August 1978 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab. Nach dem praktischen Jahr am Klinikum der Stadt Nürnberg und der Universitätsklinik Erlangen bestand ich am 20. 11. 1979 den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Die Approbation erhielt ich am 27. 11. 1979.

